

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-335963

(43)Date of publication of application : 26.11.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12M 1/00

C12M 1/34

C12Q 1/68

(21)Application number : 2002-053473

(71)Applicant : SANYO ELECTRIC CO LTD

(22)Date of filing : 28.02.2002

(72)Inventor : IWAMA AKIFUMI
SEKIGUCHI TATSUHIKO

(30)Priority

Priority number : 2001076706

Priority date : 16.03.2001

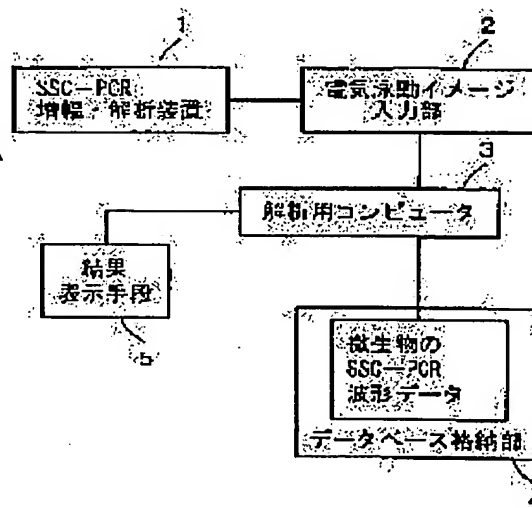
Priority country : JP

(54) SYSTEM, METHOD AND PROGRAM FOR IDENTIFYING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To identify a microorganism in a sample by collation with the database of the waveform data for luminance distribution obtained from an electrophoretic image.

SOLUTION: The method for identifying the aimed microorganism comprises the following procedure: a DNA fragment in a sample is amplified using an SSC-PCR amplifier/analyzer 1 to obtain an electrophoretic image; the image is then converted into the corresponding image data with an electrophoretic image input unit 2, the data is taken in an analyzing computer 3, which, in turn, performs an operation for the correlation between a sample waveform data and the reference waveform data stored in a database memory 4 and selects a data of greater correlation (similarity) and displays it on a result display means 5, wherein, among the sample waveform data, the correlation to be put to the operation is between portions with the peaks coinciding with each other and the whole reference waveform data or between only portions where the respective peaks of the sample waveform data and the reference waveform data coincide with each other.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

27.12.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-335963
(P2002-335963A)

(43) 公開日 平成14年11月26日 (2002. 11. 26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		1/34	B 4 B 0 2 9
1/34		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2002-53473(P2002-53473)
(22) 出願日 平成14年2月28日(2002. 2. 28)
(31) 優先権主張番号 特願2001-76706(P2001-76706)
(32) 優先日 平成13年3月16日(2001. 3. 16)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001889
三洋電機株式会社
大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号
(72) 発明者 岩間 明文
大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号 三
洋電機株式会社内
(72) 発明者 関口 達彦
大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号 三
洋電機株式会社内
(74) 代理人 100075258
弁理士 吉田 研二 (外2名)

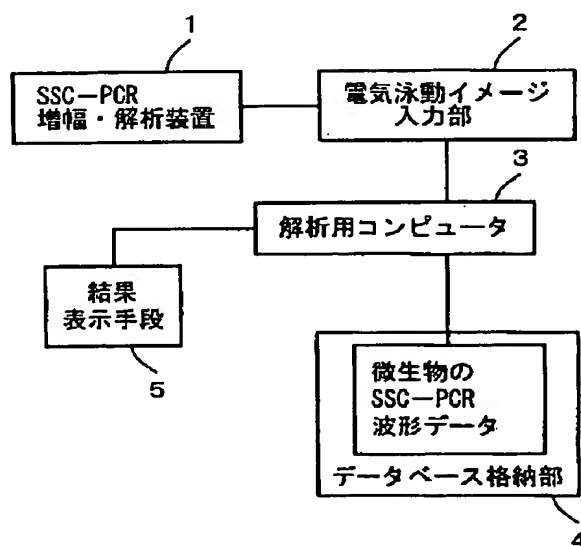
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物識別装置及び微生物識別方法並びに微生物識別プログラム

(57) 【要約】

【課題】 電気泳動像から得られた輝度分布の波形データをデータベースと照合してサンプルの微生物を識別する。

【解決手段】 SSC-PCR増幅・解析装置1でサンプルのDNA断片を増幅し、電気泳動像を得る。電気泳動は電気泳動イメージ入力部2で画像データに変換され、解析用コンピュータ3に取り込まれる。解析用コンピュータ3は、サンプル波形データとデータベース格納部4に格納された標準波形データとの相関を演算し、相関(類似度)の大きいものを選択して結果表示手段5に表示する。サンプル波形データのうち、ピークが一致する部分と標準波形データの全体との相関演算、あるいはサンプル波形データと標準波形データのピークが一致する部分のみの相関演算を用いて選択する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、

前記サンプル波形データの一致する部分を用いて前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する演算手段と、

を有することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項2】 請求項1記載の装置において、

前記演算手段は、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項3】 請求項1記載の装置において、

前記演算手段は、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項4】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算する第2演算手段と、

を有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項5】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算する第2演算手段と、

を有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項6】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示す

サンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算する第2演算手段と、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算する第3演算手段と、

を有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関と前記第3演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載の装置において、

前記抽出手段は、

前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかを所定幅及び所定高さで規格化する手段と、

前記規格化された波形データと他の波形データとの乗算結果に基づいて一致を判定する手段と、

を有することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の装置において、

前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかは、所定の規格化関数で整形されたものであることを特徴とする微生物識別装置。

【請求項9】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、

前記サンプル波形データの一致する部分を用いて前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

を有することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項10】 請求項9記載の方法において、

前記演算するステップでは、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項11】 請求項9記載の方法において、

前記演算するステップでは、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項12】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準

10

20

30

40

50

波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

を有し、複数の類似度に基づいて照合することとを特徴とする微生物識別方法。

【請求項13】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算するステップと、

を有し、複数の類似度に基づいて照合することとを特徴とする微生物識別方法。

【請求項14】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、

前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、

前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算するステップと、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算するステップと、

を有し、複数の類似度に基づいて照合することとを特徴とする微生物識別方法。

【請求項15】 請求項9～14のいずれかに記載の方法において、

前記抽出するステップは、

前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかを所定幅及び所定高さで規格化するステップと、

前記規格化された波形データと他の波形データとの乗算結果に基づいて一致を判定するステップと、

を含むことを特徴とする微生物識別方法。

【請求項16】 請求項9～15のいずれかに記載の方法において、

前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの

少なくともいずれかは、所定の規格化関数で整形されたものであることを特徴とする微生物識別方法。

【請求項17】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとをコンピュータを用いて照合することにより微生物を識別するためのプログラムであって、前記コンピュータに対し少なくとも、

前記サンプル波形データと前記標準波形データとの一致をプロセッサに判定させ、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの全部または一部の相関演算を前記プロセッサに相関演算を実行させ、

前記相関演算の結果とメモリに記憶された所定のしきい値とを前記プロセッサに比較させることを特徴とするプログラム。

【請求項18】 複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとをコンピュータを用いて照合することにより微生物を識別するためのプログラムであって、前記コンピュータに対し少なくとも、

前記サンプル波形データと前記標準波形データとの一致をプロセッサに判定させ、

前記サンプル波形と前記標準波形データの相関演算を前記プロセッサに実行させてメモリに記憶させ、

前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの全部または一部の相関演算を前記プロセッサに実行させて前記メモリに記憶させ、

複数の相関演算の結果と前記メモリに記憶された所定のしきい値とをプロセッサに比較させることを特徴とするプログラム。

【請求項19】 請求項1～3のいずれかに記載の装置において、

前記演算手段は、前記サンプル波形データと前記標準波形データの一致する部分の面積を用いて前記相関を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項20】 請求項19記載の装置において、

前記演算手段は、前記相関として、前記標準波形データの全ピークのうち前記サンプル波形データのピークに一致するピーク的面積と、前記標準波形データの全ピーク的面積の比率を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項21】 請求項1～3のいずれかに記載の装置において、

前記演算手段は、前記標準波形データ同士的一致部分を除去して得られる直交化標準波形データを用いて前記相関を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項22】 請求項1～3のいずれかに記載の装置において、

前記演算手段は、前記サンプル波形データを所定の DNA サイズ幅で量子化したデータ、及び前記標準波形データを前記所定の DNA サイズ幅で量子化したデータを用いて前記相関を演算することを特徴とする微生物識別装置。

【請求項 23】 請求項 9～11 のいずれかに記載の方法において、前記類似度を演算するステップでは、前記サンプル波形データと前記標準波形データの一致する部分の面積を用いて前記類似度を演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項 24】 請求項 23 記載の方法において、前記類似度を演算するステップでは、前記標準波形データの全ピークのうち前記サンプル波形データのピークに一致するピーク的面積と、前記標準波形データの全ピーク的面積の比率を演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項 25】 請求項 9～11 のいずれかに記載の方法において、前記類似度を演算するステップでは、前記標準波形データ同士的一致部分を除去して得られる直交化標準波形データを用いて演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項 26】 請求項 9～11 のいずれかに記載の方法において、前記類似度を演算するステップでは、前記サンプル波形データを所定の DNA サイズ幅で量子化したデータ、及び前記標準波形データを前記所定の DNA サイズ幅で量子化したデータを用いて演算することを特徴とする微生物識別方法。

【請求項 27】 請求項 17 記載のプログラムにおいて、前記相関演算は、前記サンプル波形データと前記標準波形データの一致する部分の面積を用いて実行されることを特徴とするプログラム。

【請求項 28】 請求項 27 記載のプログラムにおいて、前記相関演算は、前記標準波形データの全ピークのうち前記サンプル波形データのピークに一致するピーク的面積と、前記標準波形データの全ピーク的面積の比率を演算することにより実行されることを特徴とするプログラム。

【請求項 29】 請求項 17 記載のプログラムにおいて、前記相関演算は、前記標準波形データ同士的一致部分を除去して得られる直交化標準波形データを用いて実行されることを特徴とするプログラム。

【請求項 30】 請求項 17 記載のプログラムにおいて、前記相関演算は、前記サンプル波形データを所定の DNA

A サイズ幅で量子化したデータ、及び前記標準波形データを前記所定の DNA サイズ幅で量子化したデータを用いて実行されることを特徴とするプログラム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプル DNA のサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する技術に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、家庭等から排出される有機系廃棄物（生ゴミ）等をコンポスト化（肥料化）する生ゴミ処理機が開発されている。生ゴミ処理機によるコンポスト化では、有機物分解過程において温度等をモニタすることによりコンポスト化の度合いを評価し、この評価に基づいて良質な肥料が生成されるように生ゴミ処理の状態を調整している。

【0003】一方、より良質な肥料を生成するためには、生ゴミ処理機の内部で機能する微生物群の情報が必要であり、また、生成された肥料の添加により土壌の改良を進めるためにも土壌中の微生物群の情報が必要となる。

【0004】他方、患者のサンプルから病原性細菌を単離培養して、生化学検査などによりその病原性細菌を同定している。このとき、DNA から直接細菌を同定できれば、臨床医学的にも重要な方法となる。

【0005】微生物群の情報を得る方法としては、細菌群に含まれる個々の細菌を単離して生化学検査する方法がある。しかし、この方法は長時間を要する上、単離の困難な細菌には適用できない問題がある。

【0006】また、DNA 分析を行うことにより微生物群の情報を得る方法も知られている。DNA 分析を行うには DNA を増幅する必要があり、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法が用いられる。PCR 法では、増幅しようとする DNA（鋳型 DNA）の両端の塩基配列に相補な塩基配列を有するプライマー及び耐熱性 DNA ポリメラーゼを用い、熱変性、アニーリング、伸長反応の 3 段階からなるサイクルを繰り返すことで鋳型 DNA とほぼ同じ DNA 断片を増幅することができる。具体的には、微量にしか存在しない細菌の 1 個の DNA 中の所定の断片を例えば 10 万～100 万倍に増幅することができる。PCR 法については、例えば USP 4, 683, 195 号等に記載されている。

【0007】但し、PCR 法を用いるためには、鋳型 DNA の一領域の少なくとも両端の塩基配列が既知であることが前提であり、生ゴミ処理機内の微生物の種類及び配列が既知でないとこれらの微生物の DNA 断片を増幅できないというジレンマが生じる。

【0008】そこで、単一のプライマーで塩基配列の情

報なしに一種類のDNAから同時に多数の種類DNA断片を増幅するRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法もしくはAP-PCR (Arbitrariness Primed-Polymerase Chain Reaction) 法が提案されている。これらの方法では、PCRの反応時にプライマーのアニリング温度を下げ、さらに反応液中のマグネシウムイオン濃度を上げることによりプライマーの結合時の配列特異性を低下させる。すると、プライマーはミスマッチを伴って微生物のDNAに結合し、DNA断片が複製されることになる。単一のプライマーにより何らかのDNA断片が多量に増幅された後、増幅されたDNA断片をゲル電気泳動法により分離することによりDNAフィンガープリントが得られ、このDNAフィンガープリントを分析することにより微生物の情報を得ることができる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このようなRAPD法もしくはAP-PCR法を生ゴミ処理機や土壌内のように複数の微生物から構成される微生物群に適用する場合、増幅されるDNA断片の種類数が多すぎるために増幅されたDNA断片から微生物群を構成する微生物を識別することが困難となる。

【0010】もちろん、理論的には、塩基配列が既知のDNA断片群のフィンガープリントを標準的なフィンガープリント群としてデータベース化し、サンプルのフィンガープリントをこのデータベースのフィンガープリントとそれぞれ照合することで微生物を識別することが可能であるが、得られるフィンガープリントの形は種々であり、ノイズも含まれることから高精度の識別は困難であるのが実状である。

【0011】本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みなされたものであり、その目的は、サンプルとデータベースのフィンガープリント、具体的には電気泳動画像から得られた輝度の波形データを高精度に照合し、もって微生物を高精度に識別できる装置及び方法並びにプログラムを提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、前記サンプル波形データの一致する部分を用いて前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する演算手段とを有することを特徴とする。

【0013】ここで、前記演算手段は、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算することが好適である。

【0014】また、前記演算手段は、前記サンプル波形

データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算することが好適である。

【0015】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算する第2演算手段とを有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする。

【0016】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算する第2演算手段とを有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする。

【0017】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する装置であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出する抽出手段と、前記サンプル波形データと前記標準波形データの相関を演算する第1演算手段と、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの相関を演算する第2演算手段と、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の相関を演算する第3演算手段とを有し、前記第1演算手段による相関と前記第2演算手段による相関と前記第3演算手段による相関に基づいて照合することを特徴とする。

【0018】本装置において、前記抽出手段は、前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかを所定幅及び所定高さで規格化する手段と、前記規格化された波形データと他の波形データとの乗算結果に基づいて一致を判定する手段とを有することが好適である。

【0019】また、本装置において、前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかは、所定の規格化関数で整形されたものとするのが好適である。

10

20

30

40

50

【0020】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法を提供する。本方法は、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、前記サンプル波形データの一致する部分を用いて前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップとを有することを特徴とする。

【0021】ここで、前記演算するステップでは、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算することが好適である。

【0022】また、前記演算するステップでは、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算することが好適である。

【0023】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法を提供する。本方法は、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算するステップとを有し、複数の類似度に基づいて照合することを特徴とする。

【0024】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算するステップとを有し、複数の類似度に基づいて照合することを特徴とする。

【0025】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとを照合することにより微生物を識別する方法であって、前記サンプル波形データのうち、前記標準波形データと一致する部分を抽出するステップと、前記サンプル波形データと前記標準波形データの類似度を演算するステップと、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの類似度を演算するステップと、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの一致する部分の類似度を演算するステップとを有し、複数の類似度に基づいて照合す

ることを特徴とする。

【0026】本方法において、前記抽出するステップは、前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかを所定幅及び所定高さで規格化するステップと、前記規格化された波形データと他の波形データとの乗算結果に基づいて一致を判定するステップとを含むことができる。

【0027】また、本方法において、前記サンプル波形データあるいは前記標準波形データの少なくともいずれかは、所定の規格化関数で整形されたものとするのが好適である。

【0028】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとをコンピュータを用いて照合することにより微生物を識別するためのプログラムを提供する。このプログラムは、コンピュータに対し少なくとも、前記サンプル波形データと前記標準波形データとの一致をプロセッサに判定させ、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの全部または一部の相関演算を前記プロセッサに相関演算を実行させ、前記相関演算の結果とメモリに記憶された所定のしきい値とを前記プロセッサに比較させることを特徴とする。

【0029】また、本発明は、複数のプライマーの各々を用いて増幅されたサンプルDNAのサイズに依存した濃度分布を示すサンプル波形データとデータベースに記憶された標準波形データとをコンピュータを用いて照合することにより微生物を識別するためのプログラムを提供する。このプログラムは、コンピュータに対し少なくとも、前記サンプル波形データと前記標準波形データとの一致をプロセッサに判定させ、前記サンプル波形と前記標準波形データの相関演算を前記プロセッサに実行させてメモリに記憶させ、前記サンプル波形データの一致する部分と前記標準波形データの全部または一部の相関演算を前記プロセッサに実行させて前記メモリに記憶させ、複数の相関演算の結果と前記メモリに記憶された所定のしきい値とをプロセッサに比較させることを特徴とする。

【0030】このように、本発明では、単にサンプル波形データと標準波形データ（データベースに記憶された波形データ）との相関演算（全体同士の相関）を行って照合するのではなく、サンプル波形データのうち標準波形データと一致する部分に着目し、この一致する部分を用いて相関演算を行う。一致する部分を用いた相関演算には2種類あり、一つはサンプル波形データのうちの一致する部分と標準波形データ全体の相関演算（すなわち、一致するピークと全体との相関）であり、第2はサンプル波形データのうちの一致する部分と標準波形データのうち一致する部分の相関演算（すなわち、一致するピーク同士の相関）である。一致する部分に着目して相

関演算を行うことでノイズの影響を抑制し、データベースのヒット率、すなわち識別率を上げることができる。

【0031】なお、本発明ではサンプル波形データと標準波形データについて、全体同士の相関（類似度1）、一致するピーク同士の相関（類似度2）、一致するピークと全体との相関（類似度3）の3つの相関値あるいは類似度を用いるが、これらの相関値あるいは類似度を適宜選択し、あるいは組み合わせる用いることができる。選択の態様としては、類似度2のみ、あるいは類似度3のみを用いることができ、組み合わせの態様としては、類似度1と類似度2、類似度1と類似度3、類似度2と類似度3、類似度1と類似度2と類似度3がある。いずれを用いるかは識別すべきサンプルに応じて決定してもよい。

【0032】また、本発明において、相関演算を行う際に、波形データの一致するピークの面積に着目して演算を行うこともできる。例えば、標準データ波形のサンプル波形と一致するピーク的面積と、標準波形データの全ピーク的面積の比率は、サンプル波形と標準データ波形の相関の度合いあるいは類似の度合いを示すことになる。相関値あるいは面積比率のいずれかをを用いても良く、相関値と面積比率をともに用いて総合的に微生物を識別することもできる。

【0033】さらに、相関演算を行う際に、標準波形データをさらに加工して用いることができる。すなわち、標準波形データが互いに近似している場合、サンプル波形との相関演算を行ってもその相関値に大きな相違が生じないことがある。このような場合には、標準波形データ同士を比較し、互いに一致するピークを除去して互いに一致しないピークのみを残すことで標準波形データを再構築する。このようにして得られる標準波形データ（直文化標準波形データ）は、ピークが互いに異なる標準波形データであり、サンプル波形データと相関演算した場合、同一微生物であれば相関が著しく増大する一方、異なる微生物であれば相関が著しく減少するため、微生物の識別が容易化される。

【0034】

【発明の実施の形態】以下、図面に基づき本発明の実施形態について説明する。

【0035】図1には、本実施形態に係る微生物識別装置の構成ブロック図が示されている。微生物識別装置は、SSC-PCR増幅・解析装置1、電気泳動イメージ入力部2、解析用コンピュータ3、データベース格納部4及び結果表示部5を有して構成される。

【0036】SSC-PCR増幅・解析装置1は、SSC-PCR法を用いてDNA断片を増幅し、得られたDNA断片の電気泳動像を作成する。SSC-PCR (Single Strain Counting Polymerase Chain Reaction) 法とは、特定の塩基配列を有するプライマーを複数用いて未知の塩基配列を有する微生物群または単一の微生物が

らDNA断片を連鎖反応的に増幅する方法であり、以下、このSSC-PCR法について簡単に説明する。

【0037】<SSC-PCR法>SSC-PCR法では、従来のPCR法と同様に熱変性、アニーリング、伸長反応の各工程を繰り返すことで増幅する。但し、SSC-PCR法では未知の塩基配列を有する微生物または微生物群に対して特定の塩基配列を有するプライマーを用いることで増幅する。熱変性工程では、DNAまたはDNA断片を加熱変性し、1本鎖にする。アニーリング工程では、プライマーがDNA鎖の増幅領域の端に結合するように熱処理を行う。伸長反応工程では、プライマーを起点としてポリメラーゼにより相補鎖を合成し、2本鎖化する。このようにDNA断片が形成され、このDNA断片から新たなDNA断片が形成されるとともに他の同種のDNAからもDNA断片が形成され、同様の反応が連鎖反応的に続くことで増幅されていく。

【0038】なお、SSC-PCR法において、長さが12塩基対(bp)のプライマーをそれぞれ用いることで、各プライマーにおいて確率的に 4^{12} (約 10^7)に1回の割合でDNA断片が出現するように調整することができ、一般に1本のDNAの長さが約 10^7 塩基対とされている微生物DNAから1種類のDNA断片だけを確率的に増幅できる。したがって、増幅されたDNA断片と微生物とを1対1で対応させることが可能である。

【0039】SSC-PCR増幅・解析装置1では、以上のようにしてDNA断片を増幅する。そして、SSC-PCR用反応溶液を用いて電気泳動法により各反応溶液において増幅されたDNA断片をサイズ(塩基対数)ごとに分画する。このとき、濃度が既知で定量可能なDNAサイズマーカーを同時に電気泳動させサイズ毎に分画する。次に、電気泳動法により得られた電気泳動像を蛍光色素で染色し、紫外線照射したときの蛍光像を撮影する。撮影には、CCDカメラを用いることができる。DNA断片は、電気泳動像ではバンドとして現れる。電気泳動像は、電気泳動イメージ入力部2に供給される。なお、電気泳動法は、異なるサイズ(塩基(対)数、長さ、分子量など)のDNAを分離するために用いられている。また、輝度分布(輝度値)は、最終的にDNAの濃度(mol/l、g/lなど)、または量(mol、gなど)を求めるために測定する。

【0040】電気泳動イメージ入力部2は、スキャナなどで構成され、電気泳動像を画像データに変換して解析用コンピュータ3に出力する。

【0041】なお、電気泳動法により電気泳動像を求めた後、その電気泳動像の画像を求めるのではなく、サイズの異なるDNAの分離方法として他のクロマトグラフィー等でも分離可能である。また、電気泳動法にも、ゲルの形態、電気の流し方など種々あり、例えば今回示した平板ゲルの他にキャピラリーにゲルを詰めたものを用いることもできる。これらの方法を用いた場合、測定値

は方法により異なるが、平板ゲルの場合は写真、CCD等を用いるのでDNA濃度は輝度値として測定する。また、キャピラリーゲルの場合は、検出器（センサ）を用いてセンサの読み値（蛍光強度や吸光度）を測定する。CCDやセンサで測定すると画像の形式をとらず、直接波形データを得ることができる。

【0042】解析用コンピュータ3は、電気泳動画像データを入力し、各ブライマーについてのDNAのサイズに依存した濃度分布、具体的には電気泳動像の輝度分布（蛍光輝度分布）を示す波形データを生成し、この波形データを予めデータベース格納部4に格納されている既知微生物の波形データと照合することにより、入力した波形、すなわちサンプルの微生物を同定する。データベース格納部4と照合して得られた結果は、CRTなどのディスプレイあるいはプリンタなどの結果表示手段5に出力する。解析用コンピュータ3における波形データの生成や波形の補正あるいはデータベース格納部4内の波形データとの照合についてはさらに後述する。

【0043】図2には、図1における解析用コンピュータ3の構成ブロック図が示されている。解析用コンピュータ3は、CPU310、ディスプレイ320、入力装置330、ROM340、RAM350、記録媒体駆動装置360、スキャナ370及び外部記憶装置380を有して構成される。

【0044】ディスプレイ320は、液晶あるいはCRT等から構成され、図1における結果表示手段5として機能することができる。入力装置330は、キーボード、マウス等からなり、各種データ及び各種指令を入力するために用いられる。ROM340にシステムプログラムが記憶される。

【0045】記録媒体駆動装置360は、CD-ROMドライブ等からなり、記録媒体390に対してデータのリード/ライトを行う。記録媒体390には、本実施形態における処理を行う微生物識別プログラムが記録されており、CPU310がこのプログラムを逐次実行する。

【0046】スキャナ370は図1における電気泳動イメージ入力部2としても機能し、電気泳動像を画像データとして入力し外部記憶装置380に格納する。

【0047】外部記憶装置380は、ハードディスク等からなり、記録媒体駆動装置360を介して記録媒体390から読み込まれた微生物識別プログラムを記憶する。また、外部記憶装置380は、既知の微生物の波形データを記憶することで図1におけるデータベース格納部4として機能することもできる。もちろん、微生物識別プログラムはネットワークを介して外部記憶装置380に記憶されてもよく、ROM340に予め記憶されていてもよい。

【0048】図3には、本実施形態の処理フローチャートが示されている。まず、SSC-PCR増幅・解析装

置1により、上記したように微生物の解析実験を行う（S1）。ここで、解析実験は、単離した微生物をサンプルとしてもよく、複数の微生物を含む微生物群をサンプルとしてもよい。解析実験を行った後、得られた電気泳動像を解析用コンピュータ3に取り込む（S2）。解析用コンピュータ3は、取り込んだ電気泳動像から、DNAサイズの関数としての輝度分布を波形データとして生成し（S3）、さらに波形データを補正する（S4）。波形データの生成は、画像データのDNサイズを横軸、輝度値を縦軸として輝度値をプロットしていくことで生成される。なお、電気泳動像が歪んでいるために輝度分布を示す波形データを正確に生成できない場合を考慮し、電気泳動像にアフィン変換を含む各種の画像補正を行った後に波形データを生成してもよい。一方、波形データの補正処理は、図4に示されるように実行される。以下、波形データ補正処理について説明する。

【0049】＜波形データ補正＞電気泳動像を染色する際に染色むらが生じたため、電気泳動像の背景にむらが生じると、輝度分布を正確に検出することができない。また、DNA断片を増幅するときに所定の塩基配列を有する鋳型DNAの適合位置にブライマーが強く結合して配置する場合はDNA断片の増幅効率が高くなる。このようなブライマーにより増幅されたDNA断片は電気泳動像において再現性のよい明瞭なバンドとして出現するが、ブライマーと鋳型DNAの適合位置との結合が弱い場合には鋳型DNAの適合位置よりも結合が強い他の位置にブライマーが結合する。このようにDNA断片の増幅反応においては競争的に反応が進行するため、ブライマーと鋳型DNAとの結合が弱い場合にはDNA断片の増幅効率が低下する。結合の弱いブライマーにより増幅されるDNA断片は電気泳動像において再現性が低く不明瞭なバンドとして出現し、信頼性が低下する。

【0050】そこで、波形補正処理においては、まず電気泳動像の背景むらを補正する（S40）。具体的には、電気泳動像においてバンドを含む矩形領域を除去し、除去した矩形領域の周辺の輝度に基づいて除去した矩形領域の補間を行う。そして、得られた背景データに基づき、以下の式により背景の輝度の影響を除去した輝度分布の波形データを生成する。

【0051】

【数1】 $Z_{new} = Z_{max} \cdot (Z1 - Z0) / (Z_{max} - Z0)$ ここで、 Z_{new} は補正後の輝度分布における輝度値、 Z_{max} は補正前の最大輝度値、 $Z0$ は補正前の最小輝度値、 $Z1$ は輝度分布におけるある点の輝度値である。上式において、 $(Z1 - Z0) / (Z_{max} - Z0)$ によりある点の全体に対する相対輝度の割合が得られ、これに Z_{max} を乗じることで相対輝度を得られる。

【0052】以上のようにして背景むらを補正した後、波形データにおいてポジティブコントロールのバンド発

光強度と量が既知であるDNAサイズマーカーのバンドの発光強度とを比較することにより、ポジティブコントロールにおいて増幅されたDNA断片を定量し、定量した値を用いてDNA断片増幅反応の増幅効率を求め、さらに増幅効率に基づいて波形データの輝度を補正する(S41)。ここで、ポジティブコントロールとは、DNA断片増幅工程において生じる誤差を除去するためのコントロール実験に用いる試料である。一般にDNA断片の増幅率は、DNAポリメラーゼやマグネシウムの濃度誤差や用いた試薬の活性の度合い、温度誤差により影響を受けるため、このような誤差を除去するために、ポジティブコントロールとして増幅されるDNA断片の種類が既知で定量可能なDNA断片を増幅するプライマーと、このプライマーに相補な塩基配列を有する鋳型DNAとを含む反応溶液を調整する。ポジティブコントロールにおいて増幅されるDNA断片は、電気泳動法により定量することが可能である。したがって、ポジティブコントロールにおいて増幅されるDNA断片の量から、DNA断片の増幅効率を求めることができる。このようにして求めた増幅効率を基にして輝度を補正することができ

る。
【0053】輝度の補正を行った後、さらに定量可能なDNAサイズマーカーのバンドの発光強度を基準として用いて複数種類のSSC-PCR用反応溶液に対応する波形データの輝度を補正する(S42)。具体的には、濃度が既知のDNAサイズマーカーのバンドの発光強度に基づいて電気泳動後の画像データの階調補正を行う。

【0054】そして、次にDNAサイズマーカーの波形データに基づいて軸合わせ及び濃度調整を行う。すなわち、電気泳動に用いるゲルが異なると、同一の条件であってもバンドの移動度が異なってくる。このため、異なるゲル間においてはバンドの位置とDNAサイズとの関係が異なることになる。そこで、異なるゲル間でも波形データの比較が可能となるように波形データの標準化(軸合わせ)を行うのである。軸合わせは、具体的には、DNAサイズマーカーの波形データに基づいて所定の変換式のパラメータを決定し、この変換式に基づいて各ゲル毎に波形データを補正する。変換式は、例えば以下の式を用いることができる。

【0055】

$$【数2】 y = m1 + \log(m2 - m3 \cdot x) / (m4 - m5 \cdot x)$$

ここで、 x は電気泳動のスタート位置からの距離、すなわち泳動距離(画素/1000)を示しており、 y はDNAのサイズを対数値($\log(bp)$)で示している。

【0056】一方、泳動距離の中間付近では、泳動距離とDNAサイズとの関係が直線に近いが、両端では泳動距離とDNAサイズとの関係が直線にならず、泳動距離に対するDNAサイズの変化量が增大する。したがっ

て、上記式により波形データの軸合わせを行うと、波形データの両端に近い領域において「引き伸ばし」が起こり、ピークの幅が広がる。また、ピークの面積も大きくなる。ピークの面積は、DNAの濃度に相当するから、軸合わせ前の波形データとピークの面積が等しくなるように、軸合わせ後の波形データのピークの高さを補正する必要が生じる。この補正が濃度調整である。

【0057】濃度調整は、以下のように行うことができる。すなわち、上記の軸合わせにおいて確定したパラメータ $m1 \sim m5$ を代入した式を $y = f(x)$ とし、この1次微分 $y' = f'(x)$ を求める。さらに、2次微分 $y'' = f''(x)$ を求める。そして、2次微分が0となる変曲点 $x0$ を求める。変曲点 $x0$ における傾き $f'(x0)$ から各点での引き伸ばし率 $f'(x)/f'(x0)$ を求める。波形データの各点での輝度値を引き伸ばし率 $f'(x)/f''(x0)$ で除算する。これにより、波形データの両端に近い領域においてピークの高さが低減され、ピークの面積が軸合わせ前と等しくなるように補正される。

【0058】なお、S40～S43の処理については、本願出願人が先に提出した特願2000-403350号にも記載されており、適宜参照されたい。

【0059】以上の補正処理を行った後、複数のプライマーについての波形データを互いに連結することで一つの波形データを当該サンプルの波形データとし、同様の手順により既知の微生物のDNA断片について得られデータベース格納部4に記憶されている波形データと照合することによりサンプルの波形データを同定することができるが、補正した波形データにもノイズは含まれており、完全に同一の条件があり得ない以上、得られた波形データをそのままデータベース格納部4の波形データと比較しても、満足する結果が得られない場合も少なくない。

【0060】そこで、本実施形態では、さらに波形データを補正することで、より高精度の照合を可能としている。

【0061】すなわち、軸合わせ及び濃度調整をした波形データに対し、解析用コンピュータ3は次に波形データの各ピークをガウス関数等の規格化関数に合わせこみ(ガウス関数で近似し)、その位置、面積及び形状のデータを抽出する(S44)。そして、各ピークのガウス関数を全て足し合わせることで、元の波形を再構築する(S45)。

【0062】図5には、規格化関数への近似及び規格化関数を用いた元の波形の再構築の様子が示されている。図において、横軸はDNAサイズであり、縦軸は輝度である。(a)はあるプライマーを用いて得られたオリジナルの波形データであり、(b)は(a)の波形を軸合わせ及び濃度調整して得られた波形データである。

(c)は(b)の波形データに対し、各ピークをガウス

関数で近似したときの波形である。ガウス関数で表現された各ピークの位置、面積、ガウス関数の形状（平均値や分散）が算出され記憶される。（d）は各ピークのガウス関数を加算することで再構築された波形データである。（b）と（d）とを比較すると、各ピークの形状は正規分布であり、小さな凹凸が除去されていることがわかる。以上の処理により、波形データの補正処理が完了する。

【0063】再び図3に戻り、以上のようにして波形データの補正を行った後は、複数のプライマーについての波形データを連結し、一つの波形データとする（S5）。そして、作成された波形データを予めデータベース格納部4に格納された波形データと照合し、いずれの波形データに該当するかを判定する（S6）。

【0064】ここで、波形データを連結する必要は必ずしもなく、連結せずに各プライマーの結果の平均（あるいは和、最大値、最小値、標準偏差など）を使う、あるいは各プライマーについて並列に処理することも可能である。したがって、S5では波形データを特定の場所に格納し、波形データセットとしてデータベース格納部4に格納された波形データと照合してもよい。

【0065】通常、S5で作成された波形データ自体をデータベース格納部4に格納された波形データ自体と比較し、所定の相関演算を行うことでその類似度を評価し、最も類似度の高い波形データをもって同定するが、本実施形態ではより多様な相関演算を行うことで、より高精度に類似を判定する。

【0066】図6には、本実施形態におけるデータベース検索処理フローチャートが示されている。まず、解析用コンピュータ3は、サンプルの波形データとデータベース格納部4内の波形データ（標準波形データ）について類似度1を算出する（S60）。類似度1とは、サンプル波形データ全体と標準波形データ全体の相関演算結果であり、具体的には、サンプル波形データをSi、標準波形データをDi、nを各波形のポイント数として、

$$\text{類似度（相互相関係数）} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i \cdot S_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n D_i^2 \cdot \sum_{i=1}^n S_i^2}}$$

で示される相関演算を行い、両波形データの類似度を演算する。演算して得られた類似度1は解析用コンピュータ3に記憶される。

【0067】次に、解析用コンピュータ3は、サンプル波形データと標準波形データについて、類似度2を算出する（S61）。類似度2とは、サンプル波形データ及び標準波形データのうち互いに一致するピーク部分のみを抽出し、一致するピーク部分同士について行なう相関演算結果であり、上式におけるSi及びDiを一致する

ピーク部分Sci、Dciとした場合の類似度である。一致するピークの抽出方法については後述する。

【0068】さらに、解析コンピュータ3は、サンプル波形データと標準波形データについて、類似度3を算出する（S62）。類似度3とは、サンプル波形データのうち標準波形データと一致するピーク部分のみを抽出し、一致するピーク部分と標準波形データ全体について行なう相関演算結果であり、上式におけるSiを一致するピーク部分Sciとした場合の類似度である。

【0069】以下、類似度1～3についてさらに詳述する。

【0070】＜類似度1＞図7には、類似度1を算出する相関演算が模式的に示されている。図において、横軸はDNAサイズであり、縦軸は輝度である。細線はサンプル波形データで太線は標準波形データである。サンプル波形データ全体と標準波形データ全体の相関演算を行い、類似度1を算出する。この場合、例えば類似度1＝0.600と算出される。この類似度1は、ある波形と別の波形の類似度を定量評価する際に一般的に用いられる類似度であり、両波形を全体として見た場合の類似度を表す。したがって、あるピーク部分が非常に一致していても他の多くの部分が不一致であれば類似度1の値は低下し、非常に一致するピークがなくても全体的に近似するピークが多くなれば類似度1の値は増大する。

【0071】＜類似度2＞図8には、解析用コンピュータ3で実行される類似度2の算出処理フローチャートが示されている。まず、解析用コンピュータ3は、サンプル波形に対してピーク位置に高さ1のバーを設定することでピークの幅及び高さを規格化する（S610）。図9には、この処理が模式的に示されている。（a）はサンプル波形データであり、（b）はピーク位置に高さ1のバーを設定して規格化したデータである。（b）は、サンプル波形データのピークがどの位置にあるかを示すデータである。

【0072】次に、図8に示されるように、標準波形データに対し、各ピークについて幅を所定の誤差係数に基づいて決定するとともにその高さを1に規格化する（S611）。図10には、この処理が模式的に示されている。（a）は標準波形データであり、例えば大腸菌E. coliの波形データである。（b）は誤差係数であり、電気泳動像を得るまでの一連の実験手順において混入すると考えられる実験誤差であり、実験的に求めることができる。誤差係数は0と1の間の任意の数値をとる。図では、DNAサイズが中間の領域では小さく、両端ほど大きくなるような誤差を想定している。（c）は（b）に示された誤差係数で幅を調整し、高さを1に規格化した波形データである。幅の調整は、具体的には（a）に示された元の幅に対して誤差係数を乗じればよい。（c）は標準波形データのピークがどの位置にあるか、及びそ

のピークの幅を示すデータである。

【0073】次に、図8に示されるように、S610で得られたサンプル波形データとS611で得られた標準波形データに対してピークの全組み合わせで乗算し、乗算結果に基づいて両ピークが一致するか否かを判定する(S612)。図11には、この処理が模式的に示されている。サンプル波形データ及び標準波形データともに高さが1に規格化されているので、両ピークが正確に一致する場合にはその乗算結果は1となり、一致しない場合には一致の度合いに応じて0から1の間の値をとることになる。したがって、ある閾値を設け、この閾値以上である場合に両ピークは一致し、閾値より小さい場合に不一致と判定することができる。一致/不一致の結果は、例えばフラグとして解析用コンピュータ3のRAM350に記憶される。

【0074】各ピークについて一致/不一致を判定した後、図8に示されるように、元のサンプル波形データ及び標準波形データに対して一致するピーク部分のみを抽出する(S613)。この抽出は、RAM350に記憶された各ピーク毎の一致/不一致に基づき行うことができる(「一致」のフラグを有するピークを残し、「不一致」のフラグを有するピークを除去する)。そして、一致するピーク部分同士で相関演算を行い類似度2を算出する(S614)。図12には、この処理が模式的に示されている。(a)は元のサンプル波形データ(規格化する前の波形データ)と元の標準波形データ(規格化する前の波形データ)の一致するピーク部分を示したものである、図中矢印部分が一致するピーク部分である。

(b)はサンプル波形データのうち一致するピーク部分の波形データと標準波形データのうち一致するピーク部分の波形データをそれぞれ示したものであり、一致するピーク部分同士の相関演算を行うことで例えば類似度2=0.847が得られる。類似度2は、一致するピーク部分同士の相関演算結果であるから、全体波形の中で一致するピークが存在し、かつ、非常によく一致する場合には類似度2は増大する。このとき、一致しないピークについては問題としない。すなわち、全体的には一致するピークが少なくても、あるピークにおいて局所的に非常によく一致する場合には類似度2は大きくなる。

【0075】＜類似度3＞図13には、解析用コンピュータ3で実行される類似度3の算出処理フローチャートが示されている。S620～S622は既述したS610～S612と同一であり、サンプル波形データ及び標準波形データを規格化し、両ピークが一致するか否かを判定する。各ピークについて一致/不一致を判定した後、元のサンプル波形データから一致するピークのみを抽出する(S623)。そして、サンプル波形データのうちの一致するピーク部分と元の標準波形データ全体について相関演算を行い、類似度3を算出する(S624)。図14には、この処理が模式的に示されている。

サンプル波形データの一致ピーク部分と標準波形データ全体の相関演算を行うことで、例えば類似度3=0.582が得られる。類似度3は、サンプル波形データについては一致するピーク部分のみを対象とし、標準波形データについては波形全体を対象としているから、一致するピーク部分について両波形が非常によく一致し、かつ一致しない部分でもある程度近似している場合に類似度が増大する。

【0076】以上のようにして類似度1～3が算出され、解析用コンピュータ3のRAM350に記憶される。そして、類似度1～3を算出して記憶した後、再び図6に示されるように、これら類似度1～3をRAM350から読み出し、またデータベース格納部4に記憶された波形データを順次読み出して、サンプル波形データに最も類似する標準波形データを選択し、その結果を出力する(S63)。

【0077】図15には、類似度1～3に基づいてサンプルを識別する処理の詳細フローチャートが示されている。まず、解析用コンピュータ3は、類似度1を所定の第1閾値と比較する(S631)。類似度1が第1閾値以上である場合には、当該標準波形データの微生物をサンプルの微生物と特定する(S632)。複数の標準波形データについての類似度1が閾値以上である場合には、閾値以上となった全ての標準波形データの微生物を出力する。

【0078】一方、類似度1が所定の閾値より小さい場合には、次に類似度3が所定の第2閾値以上であるか否かを判定する(S633)。類似度3が第2閾値以上である場合には、当該標準波形データの微生物をサンプルの微生物と特定する(S632)。もちろん、複数の微生物が該当する場合もあり得る。

【0079】そして、類似度3も第2閾値より小さいと判定された場合、次に類似度2が所定の第3閾値以上であるか否かを判定する(S634)。類似度2が第3閾値以上である場合には、当該標準波形データの微生物をサンプルの微生物と特定する(S632)。類似度2が第3閾値より小さい場合、すなわち全ての類似度1～3のいずれもが閾値より小さい場合には、該当する微生物の波形データがデータベース格納部4内に存在しないと

して、その旨を出力し処理を終了する。
【0080】このように、本実施形態では、サンプル波形データ全体と標準波形データ全体の相関演算のみを行うのではなく、両波形のピークの一致する部分に着目し、一致する部分についての相関演算も行うことで、ノイズの影響を排除し、より精度良くデータベースとの照合を行うことができる。

【0081】なお、本実施形態では類似度1～3を全て算出し、これら3つの類似度1～3を類似度1、類似度3、類似度2の順に閾値と比較しているが、比較する順序を変えて微生物を特定してもよい。例えば、類似度2

→類似度3→類似度1の順で比較する等である。

【0082】また、類似度1～3の全てを用いるのではなく、類似度2のみ、あるいは類似度3のみ、あるいは類似度2と類似度3のみを用いてサンプルの微生物を特定することもできる。例えば、類似度3のみを閾値と比較し、類似度3が大きい値を示している場合にはサンプルの微生物はデータベース内の微生物（標準株）と同種の可能性が高いと推定できる。また、類似度2と類似度3がほぼ同程度の場合にはサンプルは標準株と同一株の可能性が高いと推定できる。また、類似度2に比べて類似度3が非常に小さい場合には、同種異株の可能性が高いと推定できる。

【0083】さらに、本実施形態では、データベース格納部4に標準波形データを格納してサンプル波形データと照合しているが、波形データを規定するための特徴的なパラメータ（例えばピーク位置、ピーク値、ピーク幅、ピーク面積）等をデータベース格納部4に記憶し、サンプルと照合することもできる。

【0084】以下、類似度3を例にとり、相関演算について具体的に説明する。

【0085】図16には、あるサンプル（サンプル1）についてデータベース内の標準波形データとの類似度3の相関演算を行った結果が示されている。なお、相関演算は、48種類のプライマーにより得られた波形データを互いに連結して得られる波形データを用いたものであり、サンプル1をデータベース内の23種の微生物と比較した結果が示されている。図において、表の左欄はデータベース内の微生物の種（Species）を表しており、表の右欄の数値はサンプル1とデータベース内の各微生物との相関値（PC）を表している。相関値が高いものほど上位に示されている。例えば、表の1番目の *Escherichia coli* K12との相関値は0.914、表の13番目の *Vibrio parahaemolyticus* GTC40との相関値は0.122、表の最下位の *Campylobacter coli* GTC58との相関値は0.000である。この表からわかるように、サンプル1と *Escherichia coli* K12との相関値が0.914と他の微生物に比べて著しく高く、従ってサンプル1は *Escherichia coli* K12であると識別することができる。

【0086】なお、相関値は0.0～1.0の数値をとり、一般的には0.5以上あれば相関があると判定することが可能であるが、サンプル微生物及びデータベース内の微生物が全く異なる種であっても必ずしも相関値が0.0であるとは限らず、また、両者が同一種であっても波形ノイズの影響により相関値が1.0になるとは限らない。したがって、微生物の識別は、相関値の絶対値の他、相対的評価により行うことが好ましい。図16において、2番目に相関値の高い *Aeromonas caviae* GTC465の相関値は0.305と低く、相対的評価によりサンプル1は *Escherichia coli* K12であると識別する。

【0087】図17には、他のサンプル（サンプル2）についてデータベース内の標準波形データとの類似度3の相関演算結果が示されている。この表において、サンプル2と *Staphylococcus aureus* GTC286との相関値が0.882と著しく高く、サンプル2は *Staphylococcus aureus* GTC286であると識別することができる。なお、図17において、2番目に相関値の高い *Bacillus cereus* GTC418の相関値は0.250と低く、サンプル1の場合よりも明確に識別できる。

【0088】図18には、さらに他のサンプル（サンプル3）についてデータベース内の標準波形データとの類似度3の相関演算結果が示されている。この表において、サンプル3と *Escherichia coli* K12との相関値0.796、及び *Vibrio cholerae* GTC37との相関値0.767が著しく高い。したがって、サンプル3は *Escherichia coli* K12と *Vibrio cholerae* GTC37の2つの微生物であると識別できる。

【0089】なお、類似度3、すなわちサンプル波形データのうちの一致するピーク部分と元の標準波形データ全体についての相関演算により微生物を識別する際に、波形データのデータ値同士を比較して相関値を算出するのではなく、波形データの面積あるいは積分値を用いることも可能である。具体的には、 a_j をデータベース側のサンプルと一致する波形ピークの面積とし、 b_j をデータベース側の波形全ピークの面積として、

【数4】

$$\text{面積比} = \frac{\sum_{j=1}^k a_j}{\sum_{j=1}^m b_j}$$

により、面積比を算出する。ここで、 k はデータベース側の一致ピーク数であり、 m はデータベース側の全ピーク数である。サンプル波形とデータベース波形の相関が高いほど分子の面積は増大するから、面積比によっても2つの波形データの相関度を評価できることが理解されよう。面積比を算出することで両波形データのノイズによる相違を吸収し、耐ノイズ性に優れた相関値が得られることが期待される。

【0090】図19には、既述したサンプル1についてのデータベース内標準波形との面積比（AR）が示されている。例えば、*Escherichia coli* K12との面積比は0.866であり、2番目の *Campylobacter jejuni* GTC259との面積比は0.237である。図16に示された相関値と1番目、2番目を比較すると、

1番目：*Escherichia coli* K12：0.914（相関値）→0.866（面積比）

2番目：0.305（相関値）→0.237（面積比）であり、面積比の方が評価値の差分が拡大している。したがって、このサンプル1に関しては、面積比の方が一

層確実に微生物を識別することが容易となる。

【0091】図20及び図21には、それぞれサンプル2とサンプル3についての面積比が示されている。図20において、図17の相関値と1番目、2番目を比較すると、

1番目：Staphylococcus aureus GTC286：0.882（相関値）→0.946（面積比）

2番目：0.250（相関値）→0.138（面積比）であり、面積比の方が評価値の差分が拡大しており、相関値の場合よりも面積比を用いる方がより確実に微生物を識別できる。

【0092】また、図21において、図18の相関値と比較すると、

Esherichia coli K12：0.796（相関値）→0.821（面積比）

Vibrio cholerae GTC37：0.767（相関値）→0.827（面積比）

Camphylobacter fetus GTC260：0.576（相関値）→0.335（面積比）

であり、面積比の方が評価値の差分が拡大しており、サンプル3についても面積比を用いる方が一層確実に微生物を識別できる。

【0093】このように、相関値あるいは面積比を用いてサンプルに含まれる微生物を識別することが可能であるが、本願出願人は実験を進めた結果、いくつかのサンプルにおいては明確に微生物を識別することができない場合もあることを見出した。具体的には、サンプル内に多数の微生物が含まれている場合であり、例えば10種以上の微生物が含まれている場合、微生物間に相関値や面積比の大きな相違が見られない場合がある。

【0094】図22及び図23には、あるサンプル（サンプル4）についての相関値及び面積比の結果が示されている。サンプル4には、実際には10種の微生物が含まれており、相関値及び面積比ともこの10種の微生物の値が相対的に高くなっているものの、11番目の微生物の相関値あるいは面積比との相違は大きくない。

【0095】すなわち、相関値について、10番目の微生物と11番目の微生物の相関値は、

Clostridium perfringens GTC166：0.537

Aeromonas caviae GTC465：0.480

であり、その差は0.053に過ぎない。また、面積比についても、10番目と11番目の微生物の面積比は、

Pseudomonas aeruginosa GTC2：0.329

Campylobacter coli GTC258：0.310

であり、その差は0.019に過ぎない。

【0096】このような場合、サンプルに含まれる微生物と含まれない微生物との境界、すなわちしきい値をどこに設定すべきか決定することが困難となり、誤判定のおそれがある。したがって、サンプルに含まれる微生物の種が多数であると想定される場合には、相関演算をさ

らに工夫することが好適である。

【0097】例えば、相関値に大きな相違がない場合、データベース内の標準波形同士に大きな相違がないためとも考えられるので、標準波形データ同士を互いに比較し、一致するピークを標準波形データから除去して互いに異なる独立なピークのみを残す処理を行うことが考えられる。このように一致するピークを除去して得られる波形データは、その種固有の波形データと考えられ、サンプル波形データと相関演算を行った場合、その差異が明瞭になるものと予想される。本実施形態では、このようにデータベース内の波形データを互いに独立なピークのみを有する波形データに変換することを「直交化」と称する。このようにして直交化したデータベース波形とサンプル波形との相関演算を行い、相関値あるいは面積比を算出することでサンプルに含まれる微生物を識別する。

【0098】図24及び図25には、サンプル4について、直交化したデータベースとの相関演算を行った結果の相関値及び面積比がそれぞれグラフ化して示されている。両図において、横軸はデータベース内の微生物を示す番号であり、それぞれ図22及び図23の順位に従った番号である。すなわち、図24において、1はPlesiomonas shigelloides GTC410、2はPasteurella multocida GTC1698、3はSerratia marcescens GTC135・・・であり、図25において、1はPlesiomonas shigelloides GTC410、2はPaeteurella multocida GTC 1698、3はSerratia marcescens GTC135・・・である。また、両図において、直交化（Orthogonal）したデータベースの他、直交化しないデータベース（Normal）を用いた場合の結果も示されている。図24の10番目の微生物Clostridium perfringens GTC166と11番目の微生物Aeromonas caviae GTC465に着目すると、直交化データベースを用いた場合には10番目の微生物との相関値が増大する一方、11番目の相関値が小さくなり、相関値の差分が拡大していることがわかる。図25の面積比の場合も同様である。

【0099】図26及び図27には、図24及び図25の結果を、サンプルに含まれる微生物（In）と含まれない微生物（Out）に分けて整理した場合の相関値及び面積比が示されている。上述したように、直交化しない場合に比べて直交化した場合の相関値及び面積比ともにInとOutの差分が増大している。データベース内で一致するピークを除去することで、この一致するピークの相関値に対する寄与分を除去できるため、差分が拡大したものと解釈できる。したがって、相関値あるいは面積比を用いても微生物を識別できない場合、データベースを直交化して相関値あるいは面積比を算出することで、サンプルの微生物を識別できる可能性が高まる。

【0100】以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく種々の変更

が可能である。例えば、本実施形態において、サンプル波形データとデータベース内の標準波形データの相関演算を行う際、波形データを所定幅のDNAサイズ毎に量子化し、量子化DNAサイズ毎にその輝度値を割り当ててマトリクスデータ（1×Nのマトリクス）として保持して相関演算を行うことも可能である。例えば、図28に示されるように、あるプライマA87に対して番号11、23、59、72、93で特定される微生物が図のような波形データを示したとする。横軸はDNAサイズ（対数目盛）であり、縦軸は輝度値である。このような波形データに対し、図29に示されるようにDNAサイズ（対数目盛）を所定幅で量子化し、量子化されたサイズにそのサイズ内の平均輝度値を割り当てることでマトリクス化する。なお、図において、各マトリクスの輝度値の大小は濃淡で示されている。データベース内の標準波形データ及びサンプル波形データをともにマトリクス化し、マトリクス同士で相関演算を行うことでコンピュータでの処理時間を短縮することができる。なお、マトリクス化する場合には、ガウス分布で波形整形した後の波形データをマトリクスする他、波形整形しない生の波形データをそのままマトリクス化して用いることも可能である。

【0101】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、微生物を精度良く識別することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施形態に係る微生物識別装置の構成ブロック図である。

【図2】 図1における解析用コンピュータの構成ブロック図である。

【図3】 実施形態の全体処理フローチャートである。

【図4】 波形データ補正処理フローチャートである。

【図5】 波形データ補正処理の説明図である。

【図6】 データベース検索処理フローチャートである。

*【図7】 類似度1の算出説明図である。

【図8】 類似度2の算出処理フローチャートである。

【図9】 サンプル波形データの規格化説明図である。

【図10】 標準波形データの規格化説明図である。

【図11】 ピークの一致／不一致判定説明図である。

【図12】 類似度2の算出説明図である。

【図13】 類似度3の算出処理フローチャートである。

る。

【図14】 類似度3の算出説明図である。

10 【図15】 サンプルの推定処理フローチャートである。

【図16】 サンプル1の相関値説明図である。

【図17】 サンプル2の相関値説明図である。

【図18】 サンプル3の相関値説明図である。

【図19】 サンプル1の面積比説明図である。

【図20】 サンプル2の面積比説明図である。

【図21】 サンプル3の面積比説明図である。

【図22】 サンプル4の相関値説明図である。

【図23】 サンプル4の面積比説明図である。

20 【図24】 非直交化データベースと直交化データベースの相関値グラフ図である。

【図25】 非直交化データベースと直交化データベースの面積比グラフ図である。

【図26】 非直交化データベースと直交化データベースの相関値差分説明図である。

【図27】 非直交化データベースと直交化データベースの面積比差分説明図である。

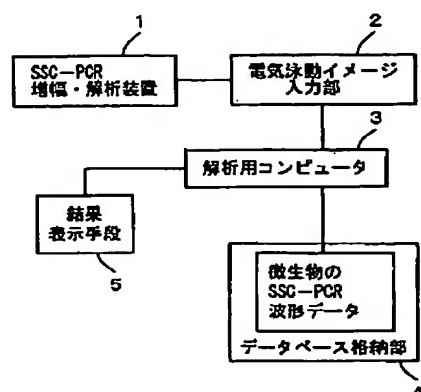
【図28】 あるプライマにおける波形データ説明図である。

30 【図29】 図28の波形データをマトリクス化した説明図である。

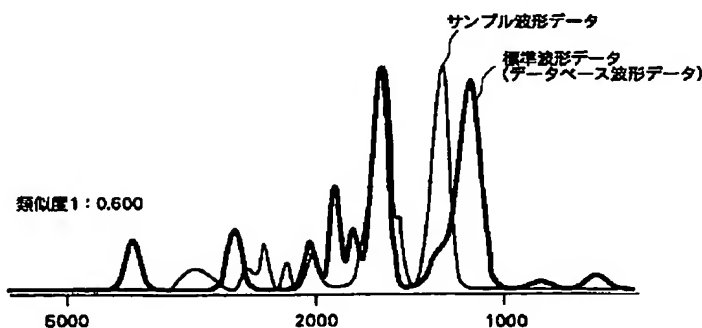
【符号の説明】

1 SSC-PCR増幅・解析装置、2 電気泳動イメージ入力部、3 解析用コンピュータ、4 データベース格納部、5 結果表示手段。

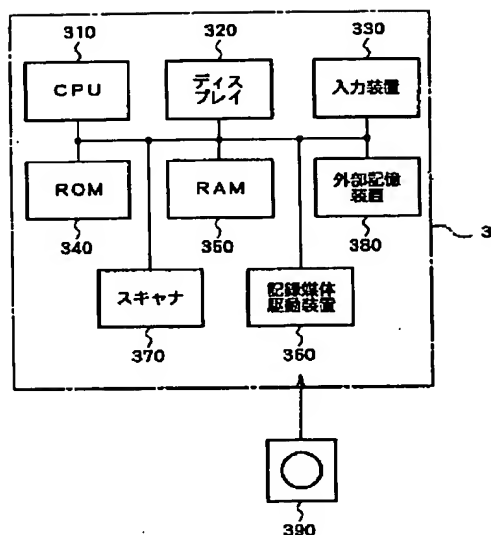
【図1】



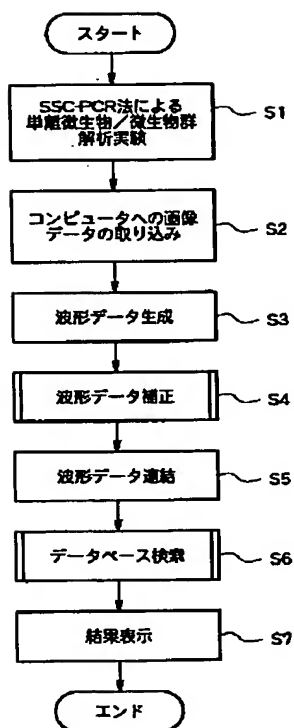
【図7】



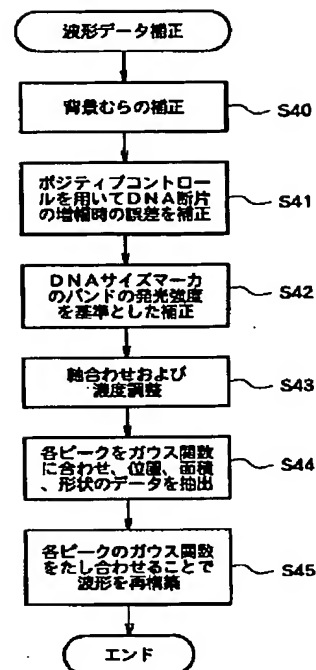
【図2】



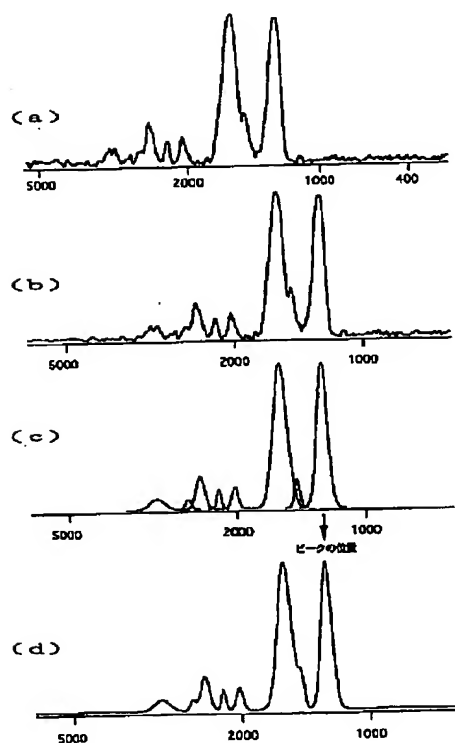
【図3】



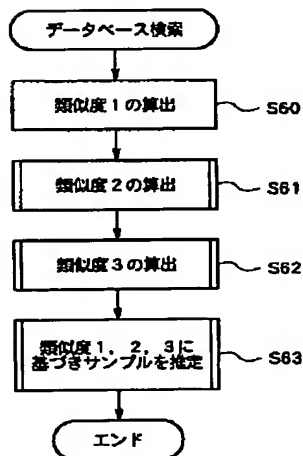
【図4】



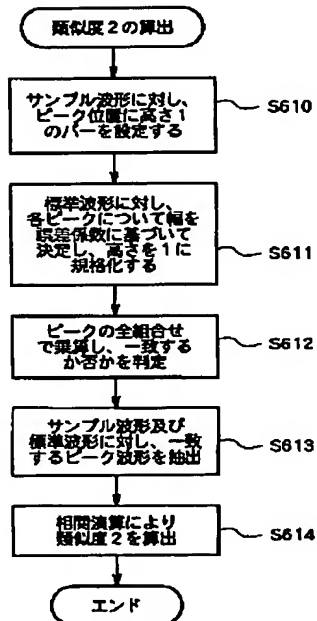
【図5】



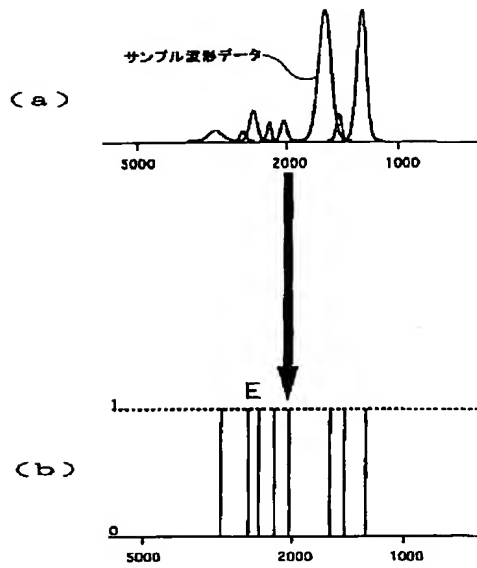
【図6】



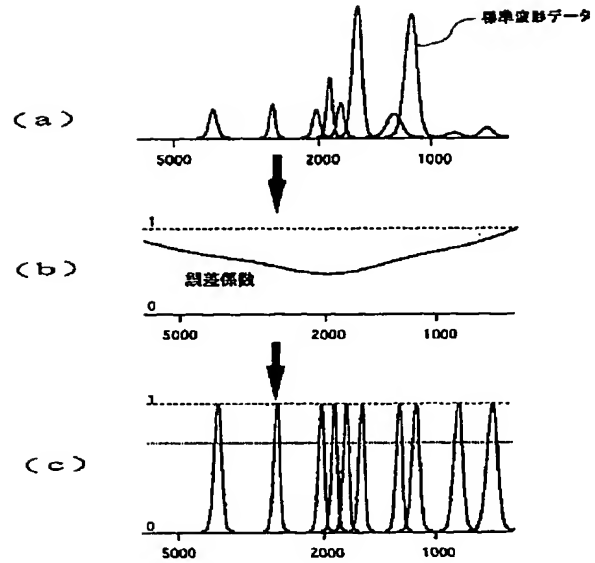
【図8】



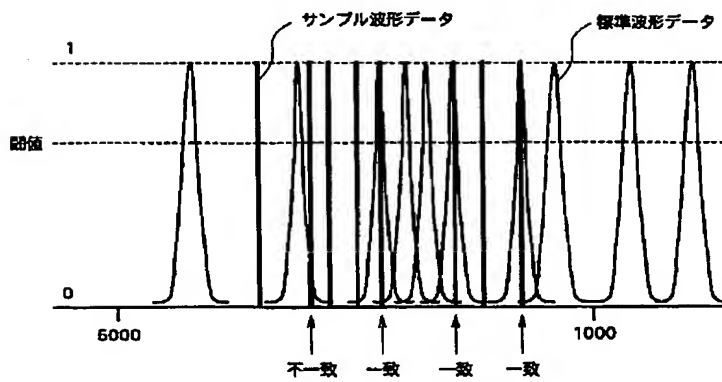
【図9】



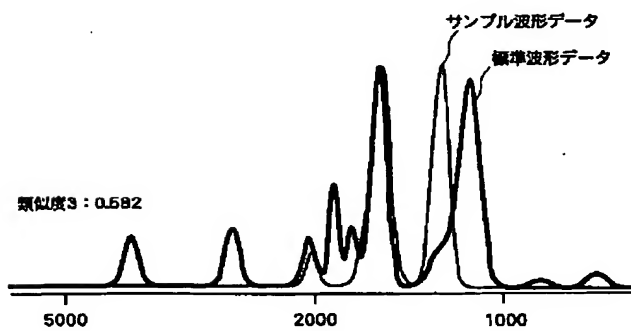
【図10】



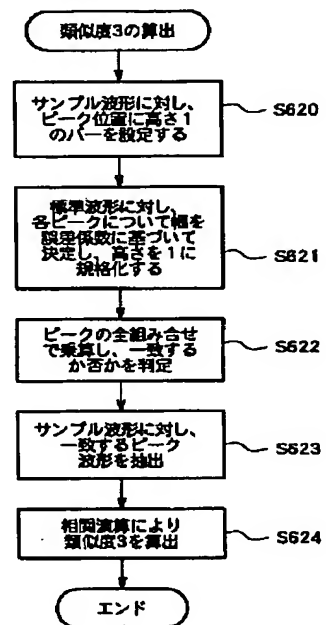
【図11】



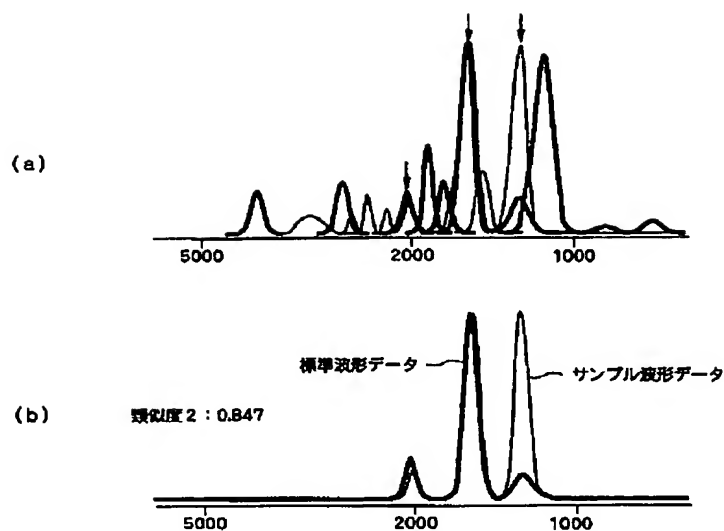
【図14】



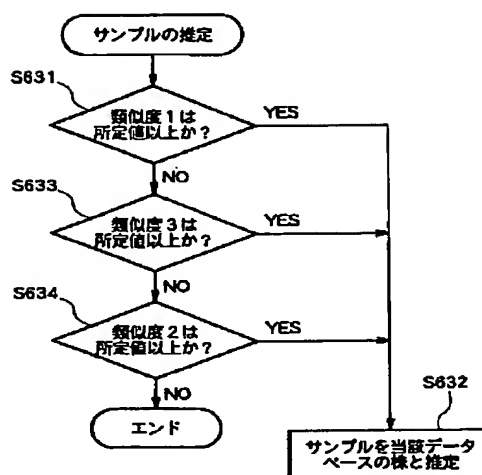
【図13】



【図12】



【図15】



【図16】

Species	PC
<i>Escherichia coli</i> K12	0.914
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.305
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.302
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.289
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.247
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.237
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.224
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.222
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.192
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.183
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.179
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.169
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.122
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.115
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.106
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.081
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.078
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.061
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.058
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.036
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.032
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.014
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000

【図17】

Species	PC
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.882
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.226
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.205
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.201
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.196
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.162
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.156
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.140
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.133
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.126
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.117
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.094
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.091
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.059
<i>Escherichia coli</i> K12	0.053
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.047
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.033
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.000
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.000
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.000

【図18】

Species	PC
<i>Escherichia coli</i> K12	0.796
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.767
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.576
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.376
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.337
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.334
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.288
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.285
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.278
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.274
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.272
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.236
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.205
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.204
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.195
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.192
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.162
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.151
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.119
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.117
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.113
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.111
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000

【図19】

Species	AR
<i>Escherichia coli</i> K12	0.866
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.237
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.189
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.170
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.124
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.110
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.101
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.089
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.087
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.083
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.075
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.066
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.055
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.053
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.047
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.041
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.031
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.021
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.019
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.015
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.014
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.003
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000

【図20】

Species	AR
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.848
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.138
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.085
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.071
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.060
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.058
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.058
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.053
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.044
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.038
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.035
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.031
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.029
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.020
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.018
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.014
<i>Escherichia coli</i> K12	0.013
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.008
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.000
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.000
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.000

【図21】

Species	AR
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.827
<i>Escherichia coli</i> K12	0.821
<i>Campylobacter</i> GTC 260	0.335
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.260
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.221
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.214
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.198
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.184
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.181
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.176
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.136
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.131
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.130
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.124
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.115
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.113
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.100
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.098
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.078
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.057
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.048
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.029
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.000

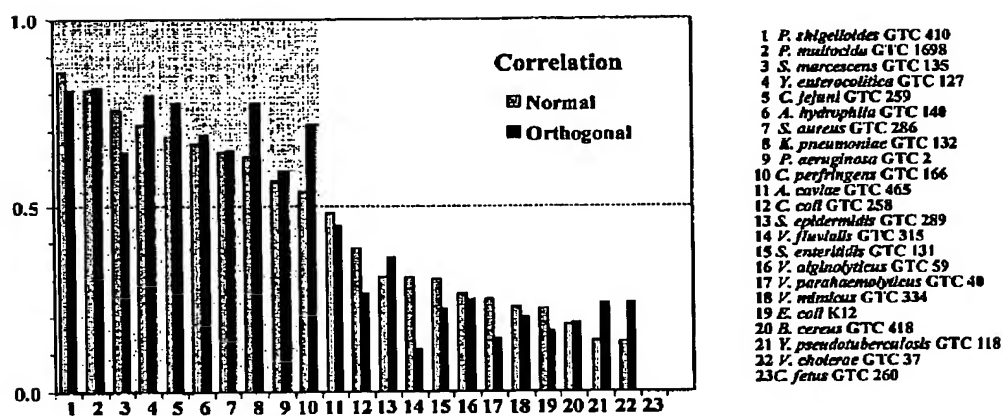
【図22】

Species	PC
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.860
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.811
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.755
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.716
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.686
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.666
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.642
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.630
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.566
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.537
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.480
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.385
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.306
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.304
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.301
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.261
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.245
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.227
<i>Escherichia coli</i> K12	0.222
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.178
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.137
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.134
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.000

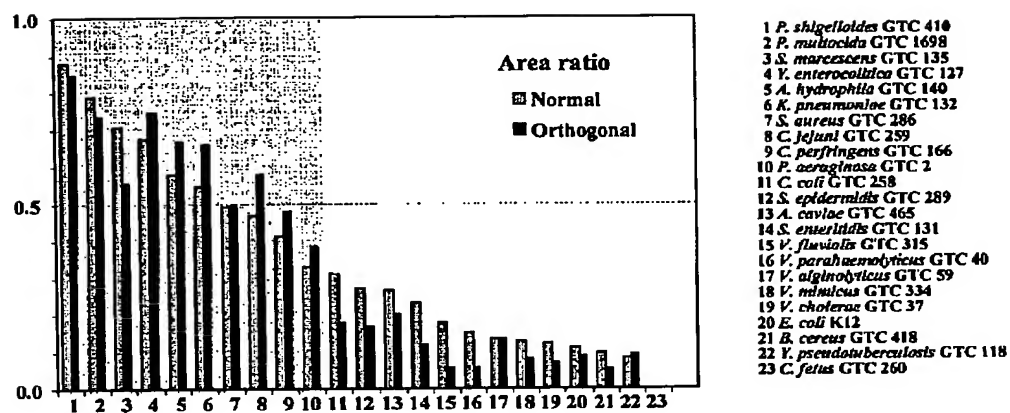
【図23】

Species	AR
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GTC 410	0.877
<i>Pasteurella multocida</i> GTC 1698	0.787
<i>Serratia marcescens</i> GTC 135	0.704
<i>Yersinia enterocolitica</i> GTC 127	0.674
<i>Aeromonas hydrophila</i> GTC 140	0.575
<i>Klebsiella pneumoniae</i> GTC 132	0.544
<i>Staphylococcus aureus</i> GTC 286	0.490
<i>Campylobacter jejuni</i> GTC 259	0.468
<i>Clostridium perfringens</i> GTC 166	0.410
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GTC 2	0.329
<i>Campylobacter coli</i> GTC 258	0.310
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GTC 289	0.272
<i>Aeromonas caviae</i> GTC 465	0.265
<i>Salmonella enteritidis</i> GTC 131	0.231
<i>Vibrio fluvialis</i> GTC 315	0.177
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> GTC 40	0.150
<i>Vibrio alginolyticus</i> GTC 59	0.134
<i>Vibrio mimicus</i> GTC 334	0.127
<i>Vibrio cholerae</i> GTC 37	0.120
<i>Escherichia coli</i> K12	0.110
<i>Bacillus cereus</i> GTC 418	0.096
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> GTC 118	0.081
<i>Campylobacter fetus</i> GTC 260	0.000

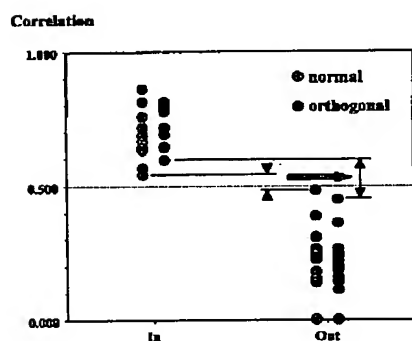
【図24】



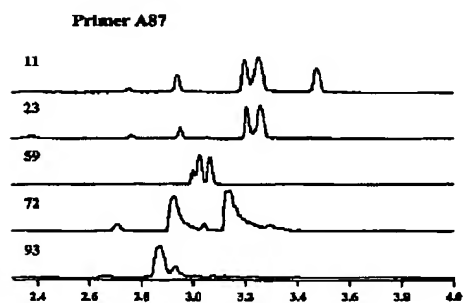
【図25】



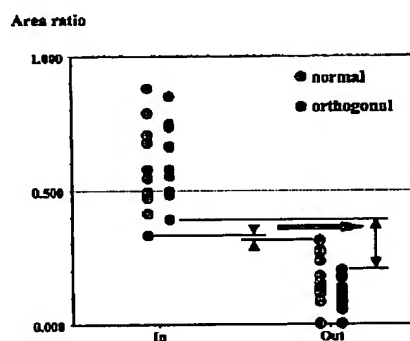
【図26】



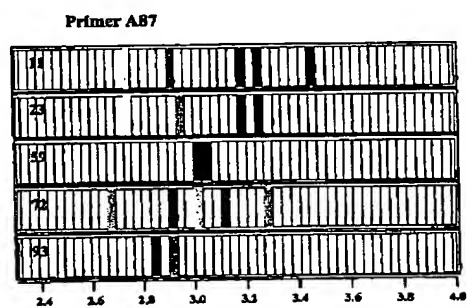
【図28】



【図27】



【図29】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 GA19 HA11
4B029 AA07 AA23 BB01 BB20 CC01
FA15
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ42 QR32
QR38 QS16 QS17 QS20 QS25
QS36 QS40 QX01